

抗生物質による大腸菌，緑膿菌，枯草菌，腸球菌の 増殖阻害とポリアミン合成阻害

浜 名 康 栄^{1)*} 横 山 洋 子¹⁾ 立 柳 聡 美¹⁾ 寺 内 恵 理¹⁾
相 崎 知 美¹⁾ 新 井 絵 梨¹⁾ 斎 藤 彩¹⁾ 内 方 薫¹⁾
大 西 肇¹⁾ 佐 藤 和佳子¹⁾ 郷 間 加奈子¹⁾ Jia Yu¹⁾
井 野 由莉恵¹⁾ 梅 村 悠紀子¹⁾ 望 月 千 晴¹⁾ 細 谷 隆 一¹⁾

(2007年 9 月30日受付, 2007年12月10日受理)

要旨： 各々異なるポリアミン合成系を持つ細菌 4 菌種が，作用機構が異なる7系統の化学構造を有する抗生物質によって増殖阻害を受けた場合の，菌体内ポリアミン構成やポリアミン含量の変動を調べた。数種の培地にて，正常増殖した対照菌体と50%増殖阻害を受けた菌体とから過塩素酸抽出したポリアミン画分の HPLC 分析を比較した。大腸菌はプトレスシン，カダベリン，アグマチン，スベルミジン，アセチルスベルミジンを，緑膿菌はプトレスシン，カダベリン，スベルミジンを，枯草菌はプトレスシン，スベルミジンとアグマチンを合成。腸球菌はポリアミンを合成せず，培地中よりスベルミジンを取り込む。グリコペプチド系のバンコマイシンでは，枯草菌と腸球菌のスベルミジンやアグマチン含量への影響は認められなかった。阻害効果の低い大腸菌に対してもポリアミンレベルに影響しなかった。 β -ラクタム系のペニシリン系（ベンジルペニシリン，ピペラシリン）とセファマイシン系（フロモキシセフ）では，大腸菌のプトレスシン，カダベリン，アセチルスベルミジンの低下を認めた。枯草菌や腸球菌ではスベルミジンレベルの低下を認めた。アミノ配糖体系のストレプトマイシン，カナマイシン，アミカシンにより，大腸菌ではスベルミジンのアセチル化が抑制され，緑膿菌ではカダベリン合成が阻害された。感受性菌と耐性菌の比較分析においても同様であった。エリスロマイシン（マクロライド系），テトラサイクリン，クロラムフェニコールでは，共通して大腸菌のアセチルスベルミジンの低下と枯草菌と腸球菌のスベルミジンの低下を認めた。オフロキサシン，ノルフロキサシン（ピリドカルボン酸系ニューキノロン）では大腸菌のアセチルスベルミジン，プトレスシン，カダベリンの低下，枯草菌でのスベルミジンの低下があるが，腸球菌のスベルミジン含量に影響しなかった。大腸菌でのスベルミジンのアセチル化はアミノ配糖体系，マクロライド系，テトラサイクリン，クロラムフェニコール，ピリドカルボン酸系により抑制されていた。 β -ラクタム系ではポリアミンレベル全体が低下していた。枯草菌でのスベルミジン合成はグリコペプチド系以外で低下した。腸球菌でのスベルミジンの取り込みは7系統の抗生物質の影響を受けなかった。

キーワード： 抗生物質，枯草菌，大腸菌，腸球菌，ポリアミン

¹⁾群馬大学医学部保健学科検査技術科学専攻 〒371-8514 前橋市昭和町3-39-15

* 別冊請求先

はじめに

細菌感染症の治療薬である抗生物質（抗生剤）（本稿では合成抗菌剤も含める）は、細菌特有の細胞壁ペプチドグリカン、リボソームサブユニット、あるいは DNA トポイソメラーゼに作用し、細菌の細胞壁合成、蛋白質合成、あるいは DNA 合成を特異的に阻害して細菌の増殖（生育や発育とする場合もあるが、本稿では増殖とした）を阻害（阻止）する薬剤である¹⁾。 β -ラクタム系抗生物質は4員環の β -ラクタム環をもち、ペニシリン系、セフェム系（セファロスポリン系とセファマイシン系）、モノバクタム系、カルバペネム系、ベネム系などがある。細菌の細胞壁ペプチドグリカン生成過程のムレインモノマー連結時にD-アラニル-D-アラニン構造に競合結合し、細胞壁合成を阻害する。グリコペプチド系抗生物質であるバンコマイシンは、細菌の細胞壁ペプチドグリカン末端の2個のD-アラニンに水素結合して、架橋結合によるポリマー化を阻害する細胞壁合成阻害剤である。

アミノ配糖体系抗生物質は、種々のアミノ糖がグリコシド結合したもので、細菌のリボソーム30S サブユニットに作用して誤翻訳を誘導し蛋白質合成を阻害する。マクロライド系抗生物質は、多員環ラクトンと糖をもち、細菌のリボソーム50S サブユニットに結合することによってペプチジル tRNA がリボソームから解離しやすくなり、蛋白質合成を阻害する。テトラサイクリン系抗生物質は、細菌のリボソーム30S サブユニットに結合して、アミノアシル tRNA のリボソームへの結合を阻害することにより蛋白質合成を阻害する。クロラムフェニコールはフェニルアラニンと類似する構造で、細菌のリボソーム50S サブユニットに作用し、ペプチド形成やペプチド鎖からの tRNA の遊離を阻害することにより蛋白質合成を阻害する。

ピリドカルボン酸系の抗菌剤は、ピリドカルボン酸を共通母核とし、細菌のトポイソメラーゼII型である DNA gyrase の α サブユニットに作用し DNA の再結合を阻害することで DNA 合成を阻害している。

一方、細菌から高等動植物にいたるまでの全ての細胞で、複数のアミノ基を持つ高塩基性のポリアミン（類）の数種類が細胞増殖に必須の生体成分として細胞内で生合成されるか細胞外から輸送される²⁻⁶⁾。ジアミノプロパン、プトレスシン、カダベリンなどのジアミン（類）は1価や2価の金属陽イオンの代替えとして種々の酵素の活性化に働き、スベルミジンなどのトリアミン（類）やスベルミンなどのテトラアミン（類）やグアニジノアミン（類）であるアグマチンは核酸や酸性蛋白質などの酸性生体分子の構造安定化に

働いている。哺乳動物細胞でのポリアミン合成に関わるアミノ酸脱炭酸酵素やアミノプロビル基転移酵素の阻害剤による抗癌剤の開発は進められている⁷⁾。これらポリアミン合成阻害剤により細菌の増殖が阻止される場合もあるが⁴⁾、細菌のポリアミン合成系のみを特異的に阻害することによる感染症治療目的の抗菌剤は開発されていない。

上記の抗生物質は細菌のポリアミン合成に関連する酵素活性を直接的に阻害する薬剤ではないが、その構造中には、アミノ酸、蛋白質、核酸、リン脂質などとイオン結合や水素結合が可能なアミノ基、カルボキシル基、水酸基、ケト基などを有し、細胞内の作用点において生体内ポリアミンと競合結合する相互作用が想定される。したがって、抗生物質により増殖阻害を受けた細菌体内でのポリアミン含量の変動を調べることにした。本稿では、グラム陰性細菌の Gammaproteobacteria 綱 Enterobacteriales 目に属する大腸菌 (*Escherichia coli*) と Gammaproteobacteria 綱 Pseudomonadales 目に属する緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、およびグラム陽性細菌の Bacilli 綱 Bacillales 目に属する枯草菌 (*Bacillus subtilis*) と Bacilli 綱 Lactobacillales 目に属する腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) のポリアミン分析を対象とした。各種の抗生物質により50%程度の増殖阻害（生育阻止）を受けた時と、対照となる正常増殖時の、各々の菌体からポリアミンを抽出し、HPLC によるポリアミン分析を行った。細菌のポリアミン構成や含量は培養に使用する培地組成によっても多少変動することから⁴⁾、種々の培地での増殖阻害とポリアミン含量の変動についても調べた。国内外で、細菌のポリアミン分析技術を有する研究室は限られ、抗生物質による増殖阻害と菌体内ポリアミン含量の変動を系統的に調べた報告は初めてとなる。

実験方法

β -ラクタム系として、ペニシリン系のベンジルペニシリン（ペニシリン G カリウム、明治製菓）とピペラシリン（ペントシリンナトリウム、富山化学）、セファマイシン系のフロモキシセフ（ナトリウム塩、塩野義製菓）を選択した。グリコペプチド系としてバンコマイシン（塩酸塩、和光純薬）を、アミノ配糖体系としてストレプトマイシン（硫酸塩、明治製菓）、カナマイシン（硫酸塩、明治製菓）、アミカシン（硫酸塩、和光純薬）を、マクロライド系としてエリスロマイシン（和光純薬）を選定した。テトラサイクリン（塩酸塩、和光純薬）とクロラムフェニコール（和光純薬）も使用した。ピリドカルボン酸系として、

quinoline を基本骨格とするニューキノロン系のオフロキサシン（タリビット，第一製薬）とノルフロキサシン（バクシダール，キョーリン製薬）を選択した。Alanine racemase と D-alanine-D-alanine ligase の酵素活性阻害剤であるD-サイクロセリン(D-cycloserine) は Sigma 社 (USA) より入手した。

大腸菌 (*Escherichia coli* IAM 12119), 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* IAM 1514), 枯草菌 (*Bacillus subtilis* IAM 12118), 腸球菌 (*Enterococcus faecalis* JCM 5803) は, 各々基準株 (Type strain) を東京大学分子細胞生物研究所 IAM Culture Collection または理化学研究所 Japan Collection of Microorganisms (JCM) より分譲を受けた。アミノ配糖体系抗生物質に耐性の *E. coli* GN 4351 と *P. aeruginosa* GN231 は群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設より提供された。Nutrient Broth (NB) (日水製薬), Trypticase Soy Broth (TSB) (Becton Dickinson, USA), Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (日水製薬), GAM 培地 (日水製薬), 合成培地 199 培地 (199) (日水製薬), RPMI1640 培地 (1640) (日水製薬), Eagle MEM 培地 (MEM) (日水製薬), Fisher's 培地 (FM), あるいは当研究室で調整した完全合成培地 (SM+L-Ala) (L-alanine に替えて D-alanine 添加の場合は SM+D-Ala) にて, 37℃ で好氣的に液体培養した。市販の天然培地である NB, TSB, BHIB, GAM は酵母エキスやペプトン等を含むので, 微量のプトレスシン, カダベリン, スペルミジン, スペルミン, アグマチンを含む。合成培地の 199, 1640, MEM, FM は動物細胞培養用の市販品で, ポリアミンを含有しない。完全合成培地 SM は 199 培地組成から L-Ala を除いた組成に近い。

濾過滅菌した各薬剤を試験管にて 4ml の培地中に 2 倍系列希釈を行い, 各菌の前培養液を各 10 μ l ずつ接種し, 20-24 時間培養後, 分光光度計 (日立 100-10) にて 600nm 波長の吸光度 (濁度) を測定し, 増殖曲線を作製した。増殖が阻止された濃度を最小増殖阻止 (発育阻止, 生育阻止) 濃度 (minimum growth-inhibitory concentration) (MIC) とした。対照の 50% の濁度を与えた濃度を推定し, 50% 増殖阻害 (発育阻害, 生育阻害) 濃度 (fifty percent growth-inhibitory concentration) (IC₅₀) とした。薬剤濃度は μ g/ml を使用した。1 章 - 3 章と 4 章 - 6 章とでは増殖阻害曲線の薬剤濃度方向が逆向きに作図されている。ポリアミン分析可能な菌体量の確保のため, 対照とする 1 - 2 本分のコントロール (薬剤無添加, 100% 増殖) と IC₅₀ 前後の 2 倍系列希釈試験管 1 - 3

本分より, 遠心分離 (10,000 xg, 10 分間) (サクマ M150) にて菌体を集めた。薬剤を含まない培地で増殖した菌と IC₅₀ 付近の薬剤濃度で増殖した菌のポリアミン分析値を比較するためである。増殖阻害の測定やポリアミン分析は後期対数増殖期の菌について行っている。

細胞は PBS (リン酸緩衝溶液) (日水製薬) にて遠心分離操作による洗浄後, 菌体湿重量を測定し, 10% (1.0M) 過塩素酸 (HClO₄) (PCA) を加えて 200 μ l とし (最終 PCA 濃度は 5-7%), 遠心分離後の上清をポリアミン抽出画分とした。メンブランフィルター (DISMIC-13HP) 濾過後の 100 μ l を使用して, 日立高速液体クロマトグラフ装置 L6000 型による, o-フタルアルデヒド (OPA) ポストラベル-陽イオン交換クロマトグラフィー法による高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) でのポリアミンの定量分析を行った⁸⁾。培養上清画分の 100 μ l も HPLC 分析した。強酸性陽イオン交換樹脂カラム (日立 2619F) (径 4mm x 長さ 50mm) はオープン装置中で 70℃ に保持した。3 種類の NaCl-クエン酸緩衝溶液による段階/直線塩濃度勾配溶出を採用した。溶出液は OPA 反応液と混合後 70℃ で加熱し, 蛍光光度計で測定し, チャート上に記録した。標準ポリアミン標品の分析ピーク高から各ポリアミンピークを定量した。分析標準のジアミノプロパン (1,3-diaminopropane) (Dap), プトレスシン (putrescine) (Put), カダベリン (cadaverine) (Cad), スペルミジン (spermidine) (Spd), スペルミン (spermine) (Spm), アグマチン (agmatine) (Agm), N¹-アセチルスペルミジン (N¹-acetylspermidine) (AcSpd) は塩酸塩を Sigma 社 (USA) から購入した。アミノプロピルカダベリン (aminopropylcadaverine) (APCad) は当研究室にて合成した。

結果と考察

研究対象とした 4 種類の代表的な真正細菌は, 各々特徴あるポリアミン合成経路を有していることが知られている^{4, 9-14)}。大腸菌は, オルニチン脱炭酸酵素により L-オルニチンよりプトレスシンを生成し, スペルミジン合成酵素によりスペルミジンを合成する。スペルミジンの N¹位のアミノ基にアセチル化する酵素活性も強い。アルギニン脱炭酸酵素とリジン脱炭酸酵素により, L-アルギニンと L-リジンより各々アグマチンとカダベリンを生成できる。プトレスシンはアグマチンより生成される部分もある。スペルミジンの酸化分解や L-2, 4-ジアミノ酪酸の脱炭酸により微量のジアミノプロパンを検出する場合もある。培養条

件によりカダベリンから微量のアミノプロピルカダベリンも生成する。アセチルスベルミジンからプトレスシンも分解生成しやすい。緑膿菌は、プトレスシンを生成し、スベルミジンを合成する。L-リジンよりカダベリンを生成するが、L-アルギニンからのアグマチン生成はない。スベルミジンの酸化分解で微量のジアミノプロパンを検出する場合もある。スベルミジンのアセチル化は検出されない。枯草菌は、プトレスシンを生成し、これからスベルミジンを合成している。L-アルギニンからアグマチンも生成する。主要なポリアミンはスベルミジンとアグマチンである。腸球菌は、ジアミンやトリアミンを合成していない。ポリアミンを含有する培地中からは主にスベルミジンを取り込んでいる。以上の4種類の細菌は、他の幾つかの細菌では検出されている2-ヒドロキシプトレスシン、ノルスベルミジン、ホモスベルミジン、スベルミン、ノルスベルミンなどは合成していない⁴⁾。アグマチンからのスベルミジンの合成系も持たない。

本報告で主に使用した、ポリアミンを含有する天然培地のNBとGAM中のポリアミン分析値と4菌種の典型的な菌体内ポリアミン含量(濃度)を、 $\mu\text{mol/g}$ wet weight (湿重量)としてTable 1に示した。天然培地TSBとBHIB中のポリアミン分析値もNBやGAMと同様の値であった。菌体内ポリアミン含量は、培地組成、培養温度と時間、菌の接種量などの培養条件を反映し、培養状況により多少変動するので、同一実験内での対照菌と増殖阻害菌との間で比較することにした。幾つかの培養条件(異なる培地)での、作用機序の異なる各種の抗生物質による4種類の細菌に対する最小増殖阻止濃度(MIC)を確認しつつ、約50%増殖阻害濃度(IC₅₀)時での集菌を行い、菌体より酸抽出したポリアミン画分と培養上清に遊離したポリアミンを分析した。同じ湿重量にあわせた、抗生物質無

添加の対照菌体からのポリアミン成分構成や含量を比較することにより、ポリアミン合成に対する抗生物質の影響を調べた。HPLC ポリアミン分析クロマトグラムそのものの比較や、菌体湿重量あたりの各ポリアミンのモル数を算出して比較した。

1章. バンコマイシン (VCM) とD-サイクロセリン (D-CS) による大腸菌, 枯草菌, 腸球菌に対する増殖阻害とポリアミン合成阻害, およびD-アラニン (alanine) 添加の影響

VCMやD-CSは細菌の細胞壁ペプチドグリカンに含まれるD-alanine部分に作用して細胞壁の合成を阻害する。そこで、L-またはD-alanineを含む完全合成培地(SM)と合成培地199, 天然培地のNBとGAMを用いて、3菌種の増殖とポリアミン構成を確認した上で、VCMとD-CSによる増殖阻害とポリアミン合成への影響を調べた。

大腸菌と枯草菌はNBや199で良好な増殖を示したが、腸球菌は良好ではなく、GAMでの増殖が良好であった。3菌種とも完全合成培地では、増殖は乏しく、L-またはD-alanineの添加での増殖の差は認められなかった。アラニンの無添加では枯草菌は全く増殖しなかった。大腸菌では、SM+L-Ala培地またはSM+D-Ala培地での培養菌体からのポリアミン抽出画分のHPLC分析は同一でプトレスシンとカダベリンのみを合成していた(Fig. 1-1A)。アラニン無添加のSMでもほぼ同一であった。199培地での培養菌体ではスベルミジンとアグマチンが検出され、アセチルスベルミジンも微量含有していた。NBでの培養菌体ではプトレスシン、カダベリン、スベルミジンが主要ポリアミンで、アグマチンを欠き、アミノプロピルカダベリンを検出する場合もある(Fig. 3-2のA-controlやFig. 4-2のA-controlやFig. 5-2のA1-control参照)。

Table 1 Cellular concentration of polyamines of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis*, and polyamine content of Nutrient Broth and liquid GAM medium used for their culture. Typical data from Fig. 1-1 (*E. faecalis* grown in GAM), Fig. 3-2 (*P. aeruginosa* grown in NB) and Fig. 5-2 (*E. coli* grown in NB, *B. subtilis* grown in NB, *E. faecalis* grown in NB) are shown. Bacteria growing at 37°C were harvested at late-exponentially growing phase. ^T, Type strain. Abbreviations for polyamines are as shown in Fig. 1-1.

	Polyamines ($\mu\text{mol/g}$ wet weight cells)							
	Dap	Put	Cad	Spd	Spm	Agm	AcSpd	APCad
<i>Escherichia coli</i> IAM 12119 ^T	0.00	0.27	0.70	0.18	0.00	0.00	0.33	0.02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1514 ^T	0.03	0.57	0.59	0.57	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118 ^T	0.00	0.00	0.00	0.98	0.00	0.08	0.00	0.00
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T								
Grown in NB	0.00	0.01	0.00	0.47	0.00	0.02	0.00	0.00
Grown in GAM	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00
Nutrient Broth ($\mu\text{mol/l}$)	0.00	0.03	0.05	0.07	0.01	0.01	0.00	0.00
Liquid GAM medium ($\mu\text{mol/l}$)	0.00	0.15	0.10	0.05	0.01	0.01	0.00	0.00

大腸菌は多様なポリアミン合成系を有することもあり、培養培地の組成によりポリアミン構成の変動が大きいことがわかる。異なる培地での大腸菌の培養菌体のポリアミン構成については、6章でも検討している。

枯草菌では、使用した培地で培養した全ての場合において、スペルミジンとアグマチンを検出し、微量成分のアグマチンは合成培地で増大傾向であった (Fig. 1-1B) (NB 培地培養菌体での HPLC 分析は Fig. 4-2

の B-control や Fig. 5-2のB-control 参照)。腸球菌では、ポリアミンを含む培地 (NBやGAM) からポリアミンを取り込んで良好に増殖する。GAM 培養ではスペルミジンを (Fig. 1-1C), NB 培養ではスペルミジンの他にアグマチンを検出する場合もある (Fig. 4-2の C-control や Fig. 5-2の C-control 参照)。

SM+L-Ala 培地または SM+D-Ala 培地における D-CS による増殖阻害曲線を Fig. 1-2のA, B, Cとし

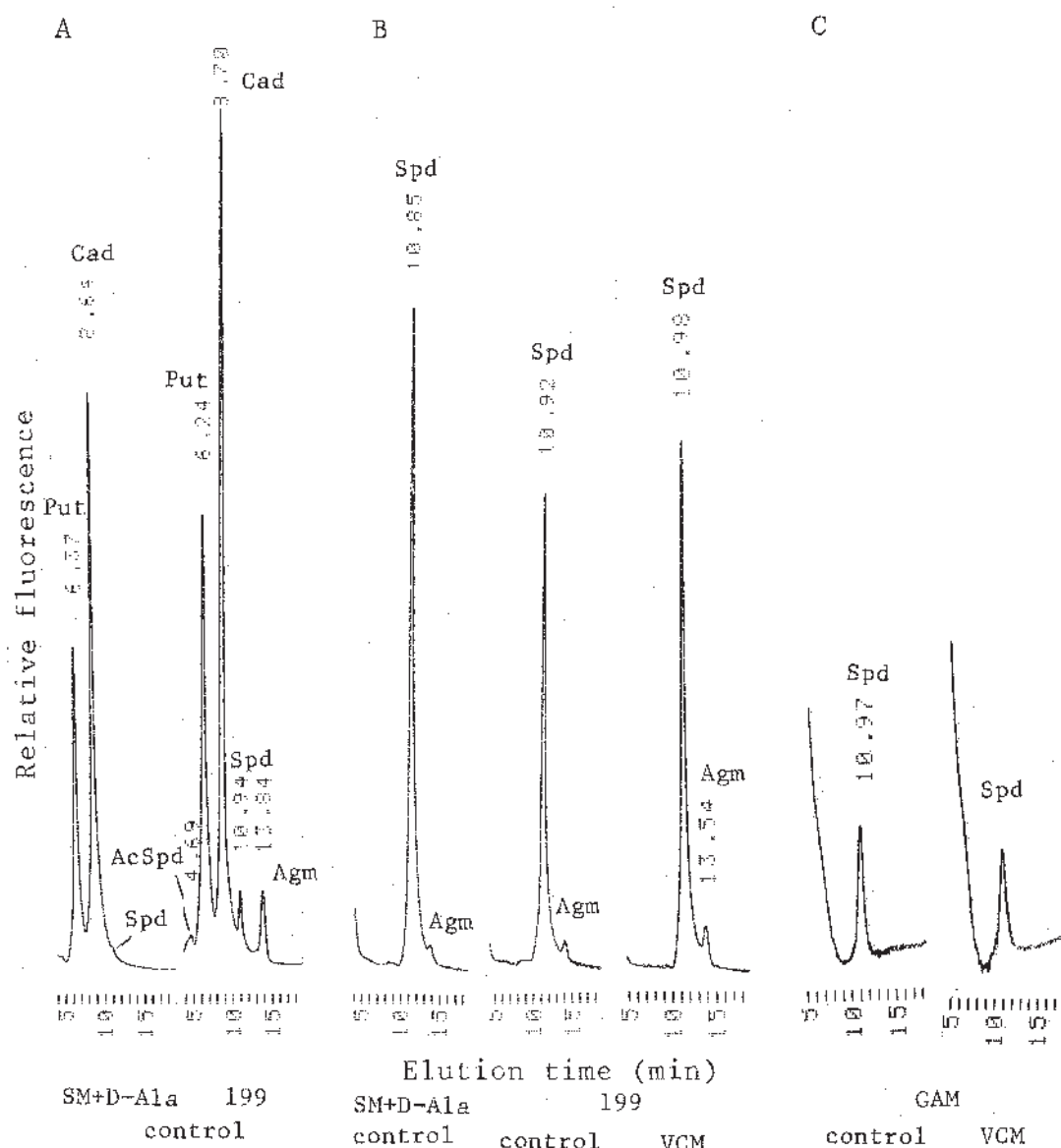


Fig. 1-1. HPLC analysis of polyamines extracted from *Escherichia coli* IAM 12119 (A), *Bacillus subtilis* IAM 12118 (B) and *Enterococcus faecalis* JCM 5803 (C) grown in the complete synthetic medium supplemented with D-alanine (SM+D-Ala), synthetic 199 medium (199) and GAM medium (GAM) in the absence (control) or presence of Vancomycin (VCM) at the concentration (IC_{50}), shown as arrow in Fig. 1-2. Bacteria growing at 37°C were harvested at late-exponentially growing phase. Abbreviations for polyamines: Dap, diaminopropane; Put, putrescine; Cad, cadaverine; Spd, spermidine; APCad, aminopropylcadaverine; Spm, spermine; Agm, agmatine; AcSpd, N¹-acetylspermidine. Printed numbers on elution peaks are corresponded to the elution time in scale of abscissa (min). Relative fluorescence and elution times are omitted in other HPLC chromatograms in the present study.

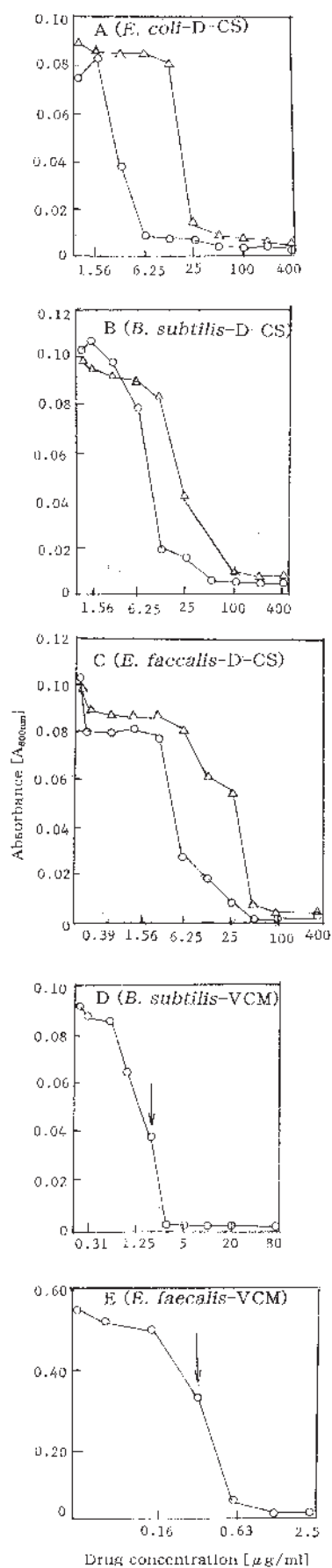


Fig. 1-2. Growth inhibition curves of *Escherichia coli* IAM 12119, *Bacillus subtilis* IAM 12118 and *Enterococcus faecalis* JCM 5803 in the complete synthetic medium containing L-Ala (SM+L-Ala) (○) or D-Ala (SM+D-Ala) (△) (in Figs. A-C), synthetic 199 medium (in Fig. D) (○) or GAM medium (in Fig. E) (○) by D-Cycloserine (D-CS) or Vancomycin (VCM). The growth of *Escherichia coli* was not inhibited by VCM at the concentration of 80 $\mu\text{g/ml}$. Arrow indicates the fifty percent growth-inhibitory concentration (IC_{50}) by VCM (Figs. D and E).

て示した。3菌種ともに、D-alanine 含有培地の方が最小阻止濃度 (MIC) や50%増殖阻害濃度 (IC_{50}) は高い濃度値となっており、D-alanine 存在下で D-CS に抵抗性を増大している結果であった。D-CS が Alanine racemase と D-Alanine-D-alanine ligase の酵素活性阻害剤であることを裏付けるデータである。SM+L-Ala 培地または SM+D-Ala 培地での培養菌体間でポリアミン構成差は認められないこと、これらの培地での実験系ではポリアミン分析に必要な増殖阻害菌体量を得ることが困難なこと、などから D-CS 阻害菌のポリアミン分析はしていない。

VCM は大腸菌には無効なため、NB での培養では高濃度 (80 $\mu\text{g/ml}$) の VCM 存在下でも増殖し、この点での培養菌体のポリアミン構成も対照菌体のそれと差異を認めなかった。199培地での枯草菌と GAM培地での腸球菌に関して、VCM による増殖阻害実験をおこなった。Fig. 1-2D, 2E に示した約50%増殖阻害濃度での菌体を集め、ポリアミン分析を行った。図D, E中で矢印で示した点がそれぞれである。対照 (control) と同一菌体量からのポリアミン画分の HPLC 分析結果から、ポリアミンの成分構成や含量には変動を認めない結果であった (Fig. 1-1B, 1C)。この結果は、VCM は枯草菌でのスペルミジン合成とアグマチン合成、および腸球菌でのスペルミジンの取り込みに影響は与えていないと判断される結果であった。両細菌でのこれらのポリアミンレベルは増殖に必須であることをも示しているといえる。細菌の細胞壁ペプチドグリカン末端の2個の D-アラニンに水素結合して、架橋結合によるポリマー化を阻害する細胞壁合成阻害剤である VCM の作用とはポリアミンは競合する可能性は低いであろう。菌体内のポリアミンレベルが上昇することで VCM の作用を軽減していることもなさそうである。

2章. 3種類の β -ラクタム系抗生物質（ベンジルペニシリン PCG、ピペラシリン PIPC、フロモキシセフ FMOX）による大腸菌、枯草菌、腸球菌の増殖阻害とポリアミン合成阻害の比較

NB にて大腸菌、枯草菌、腸球菌を培養し、PCG、PIPC、FMOX による増殖阻害実験より、各薬剤での50%増殖阻害濃度（IC₅₀）を求めるとともに、その濃度近辺での増殖菌体からポリアミンを抽出し分析した。Fig. 2-1として3菌種の増殖阻害曲線を作製した。計算上求めた IC₅₀は、大腸菌で PCG は18 μ g/ml、PIPC は0.5 μ g/ml、FMOX は0.09 μ g/ml。枯草菌で、PCG は8 μ g/ml、PIPC は12 μ g/ml、FMOX は0.08 μ g/ml。腸球菌で、PCG は0.7 μ g/ml、PIPC は0.4 μ g/ml、FMOX は36 μ g/ml。本実験条件下においては、大腸菌と枯草菌にはペニシリン系の PCG や PIPC よりセファマイシン系の FMOX の方が抗菌作用が大きく、腸球菌にはその逆の結果であった。

IC₅₀近辺の培養菌体を遠心分離操作により集菌し、酸抽出したポリアミン画分の HPLC 分析結果を、Fig. 2-1で測定した培養液の吸光度（A_{600nm}）あたりの各ポリアミンのモル数（pmol）として算出したものが Fig. 2-2である。したがって、この値は各菌体中のポリアミンレベル（濃度）を表していることになる。50%程度の増殖阻害を受けている大腸菌では、PIPC や FMOX による阻害ではポリアミン含量の低下があり、プトレシシンとカダベリンの低下が著しかった（Fig. 2-2A）。統計処理できる実験回数はないが、増殖阻害を受けても、スぺルミジン濃度の低下は軽度であり、相対的なスぺルミジン含量は大きくなっていった。分析可能範囲内で増殖阻害が最大であった PIPC の1 μ g/ml増殖菌体（Fig. 2-1A参照）では、アセチルスぺルミジンが低下し、その分スぺルミジンが増大していた。しかし、これらの薬剤がスぺルミジンのアセチル化を特異的に阻害しているのではなく、ぎりぎりの増殖時では、結果としてスぺルミジンのアセチル化が抑制されていると判断される。

枯草菌では、微量成分で定量が困難であったアグマチンを除く主要ポリアミンのスぺルミジンの定量値の変動を Fig. 2-2B として示した。増殖阻害を受けるとスぺルミジン濃度は低下する傾向にあったが、必ずしも増殖阻害程度に比例せず、PIPC によって顕著に低下した。3種類の β -ラクタム系抗生物質の中では PIPC が枯草菌のスぺルミジン合成に最も影響が大きいように思われる。

腸球菌はポリアミン合成系をもっており、培養に用いた培地の NB から主にスぺルミジンを取り込んで

いる。腸球菌によるスぺルミジンの取り込みは6章でも確認している。NB 中の主要ポリアミンはスぺルミジンである（Table1）。PCG や PIPC で増殖阻害を受けるとスぺルミジンレベルは低下傾向であるが、FMOX による阻害では増大傾向にあった（Fig. 2-2C）。セファマイシン系のFMOX では腸球菌の増殖阻害には高濃度を必要とした点もあり、ペニシリン系の PCG や PIPC と異なる影響を与えたと考えた。

細菌細胞壁合成阻害剤ではあっても、作用機構に差異のある β -ラクタム系抗生物質とグリコペプチド系抗生物質であるバンコマイシンとで、4細菌の菌体内ポリアミンレベルへの影響が異なっている点の解明は今後の課題となる。

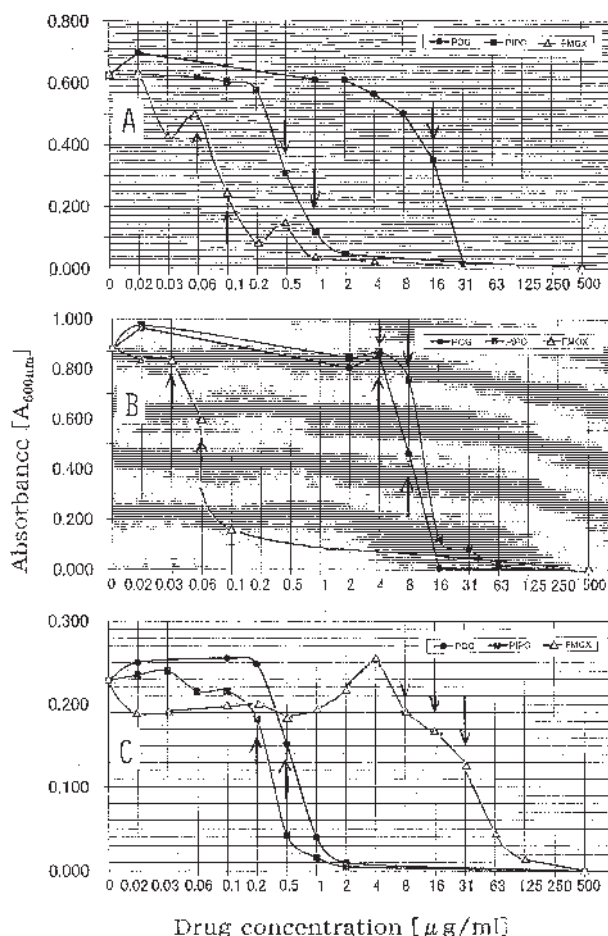


Fig. 2-1. Growth inhibition curves of *Escherichia coli* IAM 12119 (A), *Bacillus subtilis* IAM 12118 (B) and *Enterococcus faecalis* JCM 5803 (C) in Nutrient Broth by Benzylpenicillin (Penicillin G)(PCG), Piperacillin (PIPC) or Flomoxef (FMOX). Arrows indicate the tubes near at IC₅₀ used for polyamine analysis.

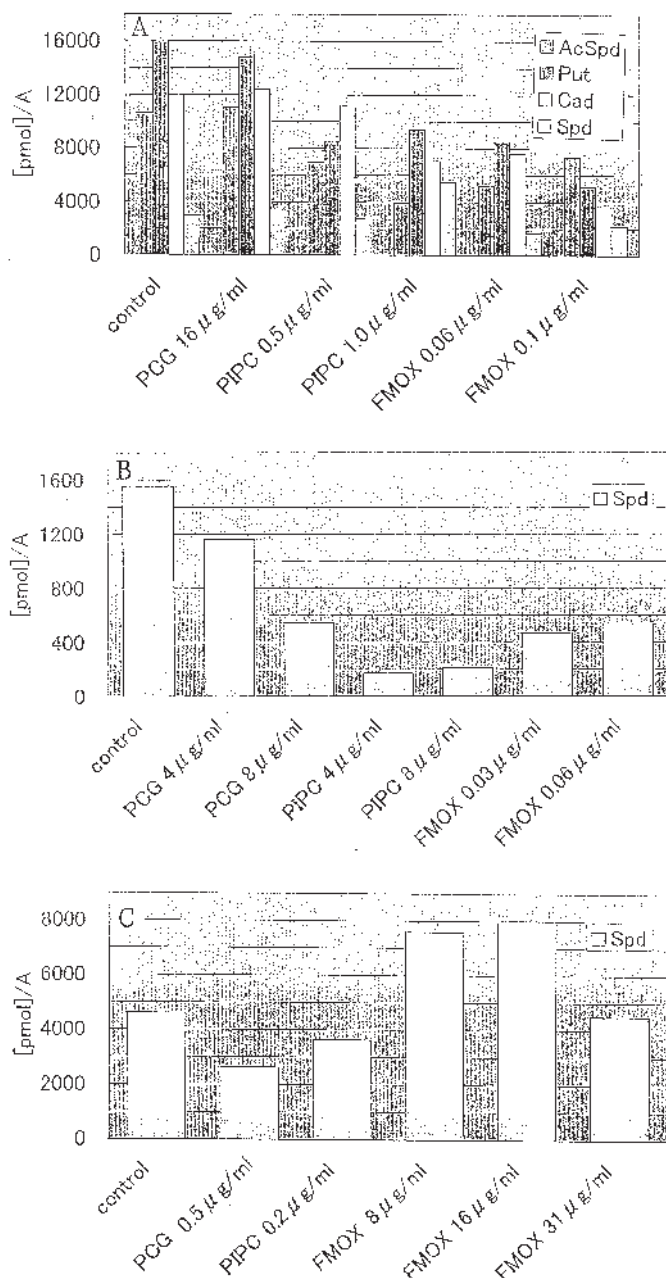


Fig. 2-2. Cellular polyamine content (pmol /absorbance at 600 nm for growth turbidity) of *Escherichia coli* IAM 12119 (A), *Bacillus subtilis* IAM 12118 (B) and *Enterococcus faecalis* JCM 5803 (C) grown in Nutrient Broth in the presence of Benzylpenicillin (Penicillin G) (PCG), Piperacillin (PIPC) or Flomoxef (FMOX) at the concentrations shown as arrows in Fig. 2-1. Abbreviations for polyamines are as shown in Fig. 1-1.

3章. 大腸菌と緑膿菌でのアミノ配糖体系抗生物質に対する感受性菌と耐性菌の増殖とポリアミン合成

カナマイシン (KM) 耐性菌はアセチル化酵素 Aminoglycoside acetyltransferase ACC (6') を産生する緑膿菌GN231を, ストレプトマイシン (SM) 耐

性菌はアデニリル酵素 Aminoglycoside adenylyltransferase AAD (3'') を産生する大腸菌 GN3451を使用した^{14,15)}。KM又はSMに対する対照基準株 (感受性菌) と耐性菌の感受性の確認のための増殖阻害曲線を Fig. 3-1に示した。NB培地にて測定したものである。アデニル化によるSM耐性大腸菌は30倍の耐性で, アセチル化によるKM耐性緑膿菌は5倍の耐性であった。

また, 培地中に, 添加する薬剤の10倍および100倍モル濃度のスペルミジンを同時添加した場合, いずれの感受性菌と耐性菌ともにKMあるいはSMによる最小増殖阻止濃度や50%増殖阻害濃度は変動しなかった。培地中のポリアミン (この場合スペルミジン) レベルがアミノ配糖体系抗生物質の細菌体内移行に影響するのではないかと考えられたのだが, 感受性測定実験からは, これら薬剤とポリアミンとの競合は確認されなかった。培地中へのポリアミン添加実験については4章と6章でも行っている。

すでに報告済みではあるが, 本研究でのポリアミンの HPLC 分析では, 陽イオン交換クロマトグラフィー法を採用していて, KM がプトレスシンとカダベリンの間に溶出され, OPA で蛍光検出されている¹⁶⁾。HPLC クロマトグラフ上にKMと表示した (Fig. 3-2C, D)。SMはポリアミンの分析範囲内に溶出されない。

SM 又は KM 添加による大腸菌または緑膿菌の菌体内および培養上清中のポリアミン構成の変化を HPLC分析し, Fig. 3-2に示した。緑膿菌では微量のジアミノプロパンを検出する場合がある。感受性大腸菌は, IC₅₀付近の10 μg/mlでの増殖で, スペルミジンに対するアセチルスペルミジンの割合が低下していた (Fig. 3-2A)。培養上清のポリアミン構成の変化はほとんどなかった。SM耐性大腸菌ポリアミン構成でも量比に若干の差がみられたものの, 統計処理しなければ識別できない程度に, 感受性大腸菌のポリアミン構成と類似していた (Fig. 3-2B)。SMで50%増殖阻害 (500 μg/ml存在下) を受けている菌体でも変化はほとんどなかった (Fig. 3-2B)。

緑膿菌の感受性菌とKM耐性菌間では, カダベリンとスペルミジンの量比に差異を認めたが, KMにより増殖阻害を受けた場合には, いずれの場合もプトレスシンの増加とカダベリンの低下が観察された (Fig. 3-2C)。培養上清中でもカダベリンが減少していたので, KMの存在下での緑膿菌ではカダベリン生産が抑

制されていると考えられる。HPLC 分析結果を各ポリアミン成分ごとにモル計算し、総計モル数に対する割合 (%) として作図したものが Fig. 3-3 であり、ポリアミン成分の相対量比の変動が分かり易い。

大腸菌群と緑膿菌群はともに Gammaproteobacteria 綱に属するが、緑膿菌にはアセチルスペルミジンが検出されないことは多くの *Pseudomonas* 種で認められている。KM の 6'-NH₂ のアセチル化による KM 耐性緑膿菌でもスペルミジンの N¹-アセチル化は起こっていないことも確認できた。

4 章. エリスロマイシン (EM)、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP) による大腸菌、枯草菌、腸球菌の増殖阻害およびポリアミン合成阻害と培地へのポリアミン添加の影響

NB 培地による大腸菌、枯草菌、腸球菌の増殖に対する EM, TC, CP の阻害効果を測定し、Fig. 4-1 とした。各菌種の 3 薬剤による 50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀) を推定し、その濃度による増殖菌体を集菌し、ポリアミン画分の分析を行った。Fig. 4-1A, 1B, 1C の中で矢印の点である。大腸菌については、3 薬剤による阻害においてアセチルスペルミジンの相対量の低下が

あり、TC 阻害菌で顕著であった (Fig. 4-2)。CP 阻害菌ではカダベリン量が低下していた。枯草菌と腸球菌では、3 薬剤によりスペルミジンが低下する傾向にあり、EM で顕著であった。

NB 培地と完全合成培地 (SM+L-Ala) (Fig. 4-3 では SM としてある) にスペルミジンを 200 μ g/ml (約 1mM) 添加した培地を作製し、この培地での EM による大腸菌の増殖阻害濃度を調べたものが Fig. 4-3 である。スペルミジンの存在により増殖そのものが良好になった結果であったが、スペルミジン存在下で EM による増殖阻害濃度そのものに変化をきたすことはなかった。3 章において、アミノ配糖体抗生物質 (KM や SM) による大腸菌や緑膿菌の増殖阻害濃度は NB 培地へのポリアミンの添加によって影響されなかったことを確認している。

培地に約 1mM スペルミジンを添加した場合は、大腸菌の菌体内ではアセチルスペルミジンの上昇が、両方の培地で認められた (Fig. 4-2D, 2E)。相当量のスペルミジンが培地中より取り込まれていて、その分アセチルスペルミジンが増大しているような結果であった。実験により菌体量は一致しないが、Fig. 4-2A (大腸菌) の control と Fig. 4-2D (大腸菌) の control が相対的に比較できる。ともに NB による培養である。上昇したアセチルスペルミジンは EM で 50% 増殖阻害を受けた場合は半分に低下していた (Fig. 4-2D, 2E)。SM 培地では大腸菌は主にプトレスシンとカダベリンのみを生成していた。

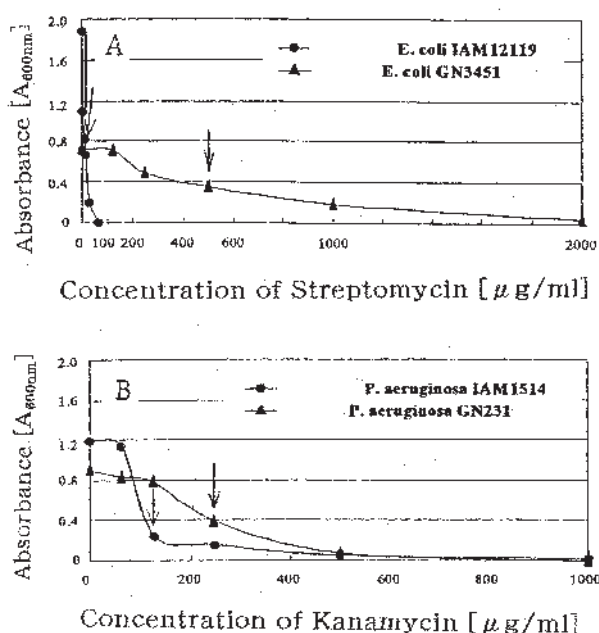


Fig. 3-1. Growth inhibition curves of *Escherichia coli* IAM 12119 (sensitive Type strain) and *E. coli* GN3451 (SM-resistant strain) grown in Nutrient Broth by Streptomycin (SM) (A), and *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1514 (sensitive Type strain) and *P. aeruginosa* GN231 (KM-resistant strain) grown in Nutrient Broth by Kanamycin (KM) (B). Arrows indicate about IC₅₀ in this experiment.

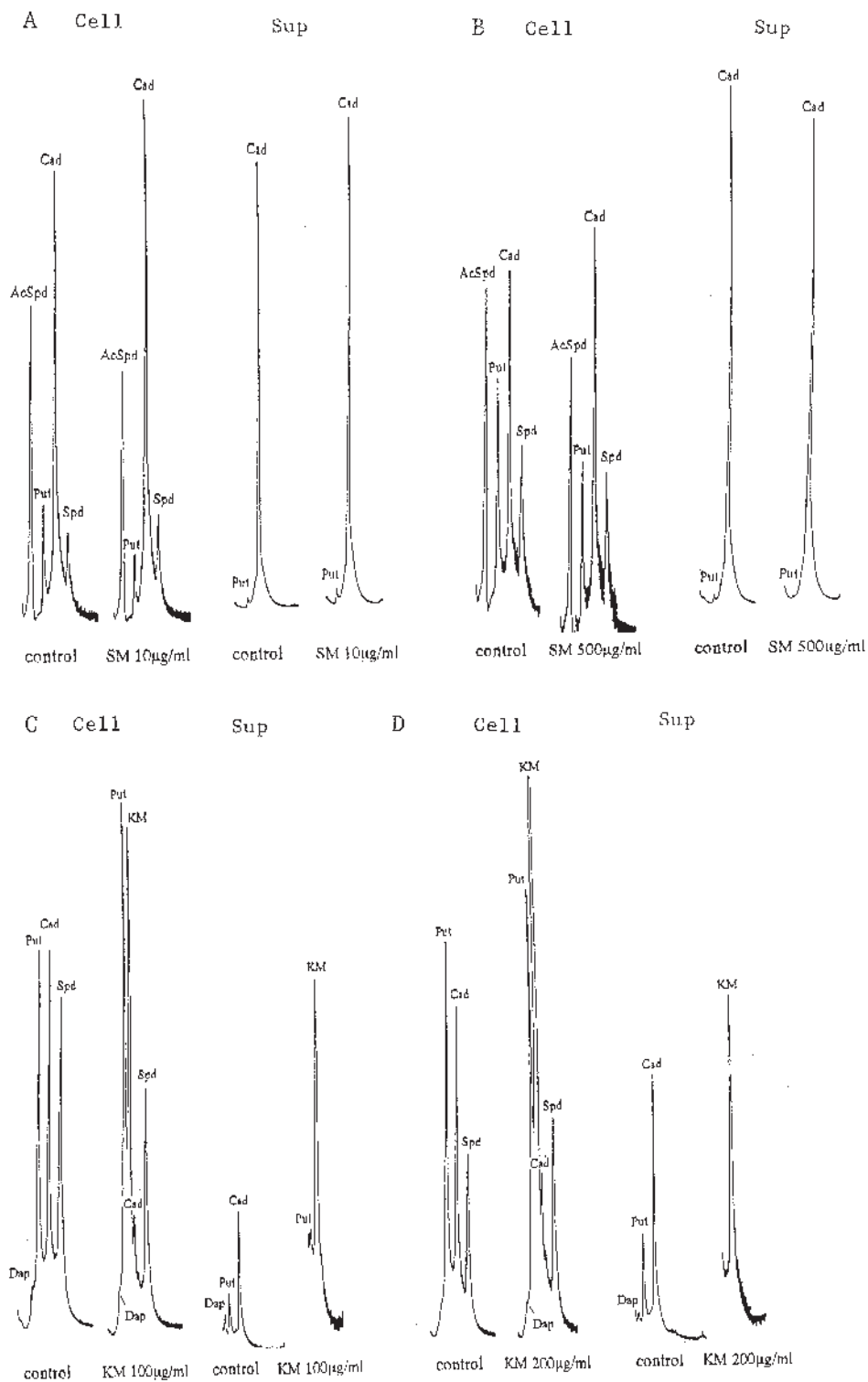


Fig. 3-2. HPLC analysis of polyamines extracted from the cells of *Escherichia coli* IAM 12119 (sensitive Type strain) (A) and *E. coli* GN3451 (SM-resistant strain) (B), and the culture supernatant (Sup) grown in Nutrient Broth in the absence (control) or presence of Streptomycin (SM) at the concentration of IC_{50} , and the cells of *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1514 (sensitive Type strain) (C) and *P. aeruginosa* GN231 (KM-resistant strain) (D), and the culture supernatant (Sup), grown in Nutrient Broth in the absence (control) or presence of Kanamycin (KM) at the concentration of 100 or 200 µg/ml. Abbreviations for polyamines are as shown in Fig. 1-1.

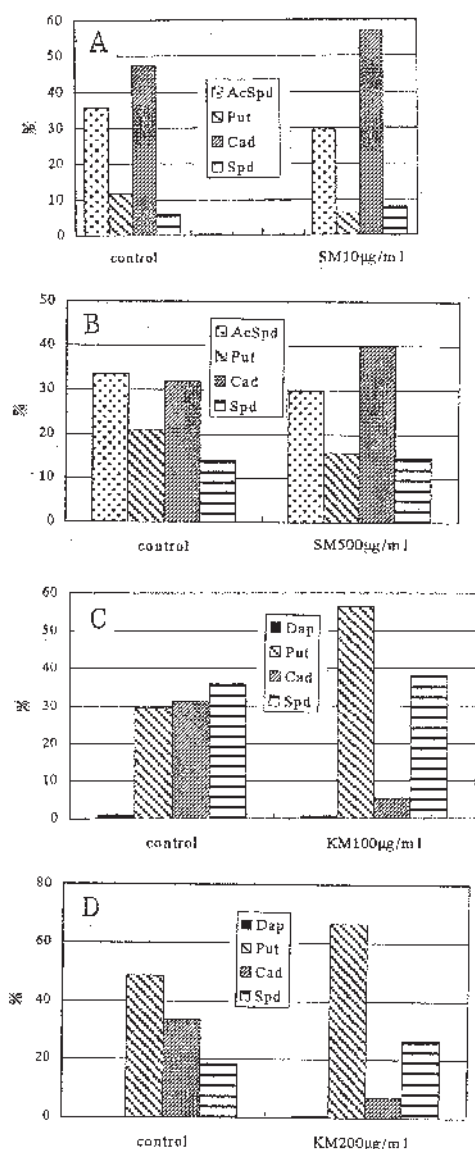


Fig. 3-3. Comparisons of polyamine distributions in the cells of *Escherichia coli* IAM 12119 (sensitive Type strain) (A), *E. coli* GN3451 (SM-resistant strain) (B), *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1514 (sensitive Type strain) (C) and *P. aeruginosa* GN231 (KM-resistant strain) (D). The bacteria were grown in Nutrient Broth in the absence (control) or presence of Streptomycin (SM) or Kanamycin (KM) at the concentration of IC_{50} . Polyamine contents ($\mu\text{mol/wet weight of cells}$) were shown as a percent (%) against the total of cellular polyamines ($\mu\text{mol/wet weight of cells}$). Abbreviations for polyamines are as shown in Fig. 1-1.

5章. ピリドカルボン酸系抗生物質による大腸菌、枯草菌、腸球菌の増殖阻害とポリアミン合成阻害
すでに1章でも述べたが、大腸菌では、Fig. 5-1に示すように、完全合成培地 (SM+L-Ala) では増殖度が低く、NB では増殖度が高い。オフロキシシン (OFLX) による増殖阻害には増殖度が低い完全合成

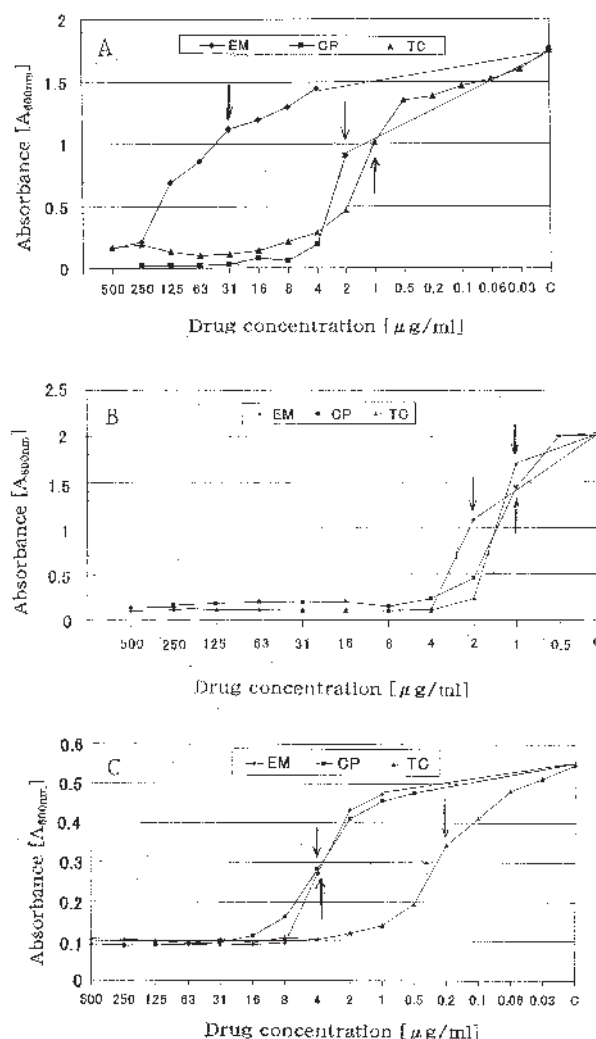


Fig. 4-1. Growth inhibition curves of *Escherichia coli* IAM 12119 (A), *Bacillus subtilis* IAM 12118 (B) and *Enterococcus faecalis* JCM 5803 (C) in Nutrient Broth in the presence of Erythromycin (EM), Chloramphenicol (CP) or Tetracycline (TC). c, control ($0 \mu\text{g/ml}$). Arrows indicate the tubes near at IC_{50} .

培地で、より高濃度を必要とした。また、他のニューキノロンであるノルフロキサシ (NFLX) による増殖阻害実験でも同様の結果であったので、以降は OFLX によるポリアミン合成への影響を調べた。

Fig. 5-2のポリアミン分析結果をみると、OFLX により50%増殖阻害 (IC_{50}) 近辺の NB 培地による培養菌体では、カダベリンとアセチルスペルミジンの低下が顕著なのが分かる。Fig.5-1中の矢印の濃度での集菌体についての HPLC クロマトグラムが示されている。プトレスシンとスペルミジンの相対量の変化は認められない。完全合成培地 SM による培養菌体では、OFLX 阻害ではプトレスシンの変動が大きかった。スペルミジンとアセチルスペルミジンの合成は NB 培地

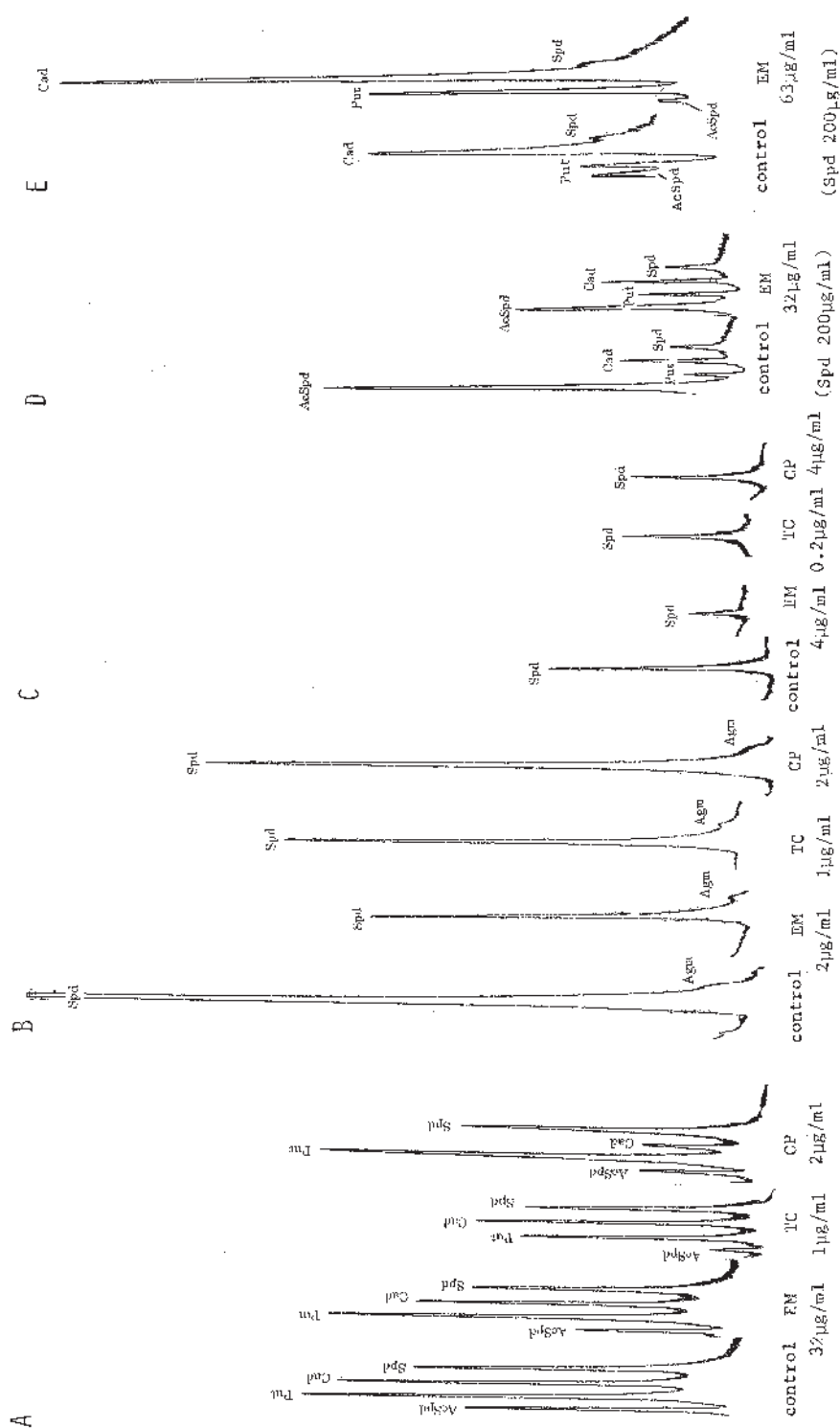


Fig. 4-2. HPLC analysis of polyamines extracted from *Escherichia coli* IAM 12119 (A), *Bacillus subtilis* IAM 12118 (B) and *Enterococcus faecalis* JCM 5803 (C) grown in Nutrient Broth in the absence (control) or presence of Erythromycin (EM), Chloramphenicol (CP) or Tetracycline (TC) at the concentrations shown as arrow in Fig. 4-1. HPLC analysis of polyamines extracted from *Escherichia coli* IAM 12119 grown in Nutrient Broth (NB) containing 200 µg/ml of spermidine (D) or the complete synthetic medium (SM+L-Ala) containing 200 µg/ml of spermidine (E), in the absence (control) or presence of Erythromycin at the concentration (IC₅₀) as shown in Fig. 4-3. Abbreviations for polyamines are as shown in Fig. 1-1.

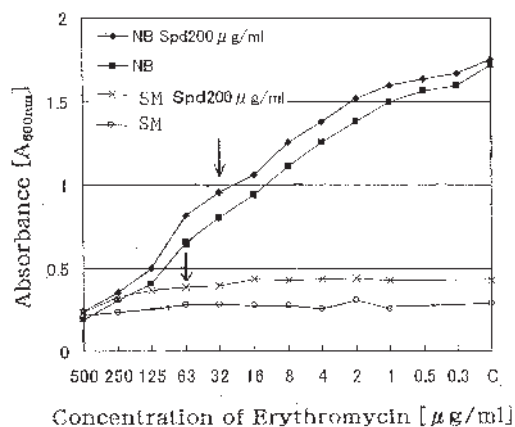


Fig. 4-3. Growth inhibition curves of *Escherichia coli* IAM 12119 in Nutrient Broth (NB) or the complete synthetic medium (SM+L-Ala) (SM) by Erythromycin in the absence or presence of spermidine (Spd) at the concentration of 200 μ g/ml. c, control (0 μ g/ml). Arrows indicate the tube near at IC₅₀.

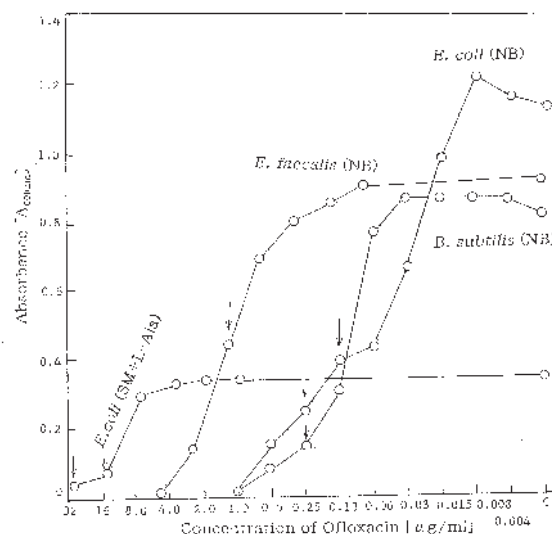


Fig. 5-1. Growth inhibition curves of *Escherichia coli* IAM 12119, *Bacillus subtilis* IAM 12118 and *Enterococcus faecalis* JCM 5803 in Nutrient Broth (NB) or the complete synthetic medium (SM+L-Ala) by Ofloxacin (OFLX). c, control (0 μ g/ml). The cells in the tube of the arrow were subjected to polyamine analysis.

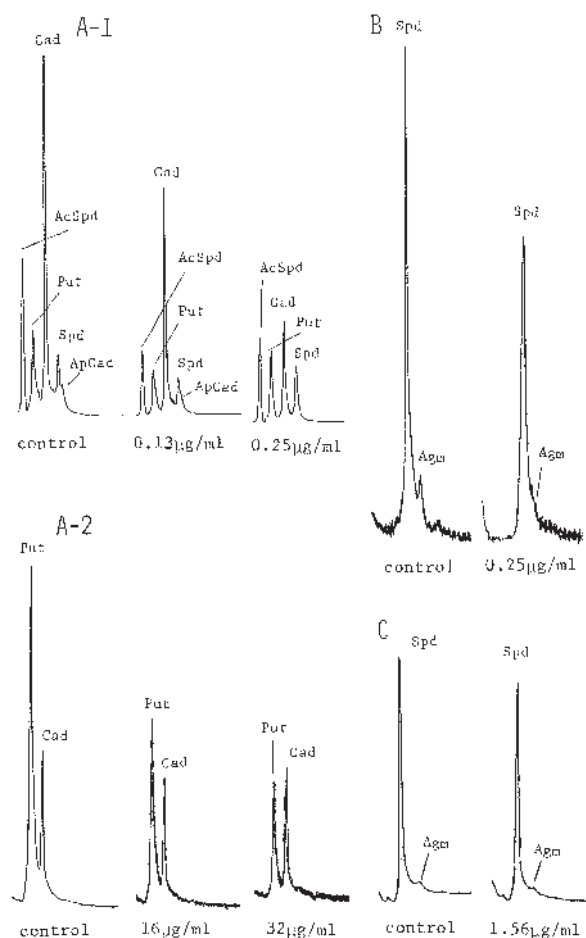


Fig. 5-2. HPLC analysis of polyamines extracted from *Escherichia coli* IAM 12119 (A) *Bacillus subtilis* IAM 12118 (B) and *Enterococcus faecalis* JCM 5803 (C) grown in Nutrient Broth (NB) (A-1, B, C) or the complete synthetic medium (SM+L-Ala) (A-2) in the absence (control) or presence of Ofloxacin (OFLX) at the concentrations shown as arrows in Fig. 5-1. Abbreviations for polyamines are as shown in Fig. 1-

に依存していることは明確なのだが、増殖阻害を受けた菌体ではプトレスシンとカダベリンは等量ずつとなり、両培地間での差がなかったのは興味深い (Fig. 5-2のA-1, A-2)。

NB 培養の枯草菌の同一菌体量からのポリアミン分析では、OFLX 阻害時でスペルミジンとアグマチンの若干の低下を認めた。NB 培養の腸球菌では、スペルミジン量に対照菌体と OFLX 阻害菌体とで差異は認められなかった。

ピリドカルボン酸系抗生物質により、大腸菌では合成量の高いポリアミン成分がかなり特異的に合成を抑制され、枯草菌では合成活性の高いスペルミジン合成が抑制され、腸球菌でのスペルミジン取り込みは阻害を受けなかった。

6 章. 天然培地と合成培地における大腸菌のポリアミン合成

1 章から 5 章においては、完全合成培地 SM, 合成培地 199, 天然培地 NB, 天然培地 GAM での培養によるポリアミン分析を行った。大腸菌はポリアミン合成経路が多様で、そのポリアミン構成は培地組成に影響を受け易いと考えられるので、他に 4 種類の培地での培養によるポリアミン構成を分析し Fig. 6-1 に示した。天然培地の TSB と BHIB による培養菌体のポリアミン構成は NB 培養による構成とほぼ同一であった (Fig. 3-2 と Fig. 4-2 参照)。合成培地の RPMI1640 と FM では菌体内アグマチン含量の増大があり、この点では合成培地 199 (Fig. 1-3) と同一傾向ではあるが、1640 培地で特に顕著であった (Fig. 6-1A)。1640 培地は他の合成培地と比較して L-アルギニンの含有量が 3 倍程であることがアグマチン生産量を高めていると考えられる。完全合成培地 SM ではプトレスシンとカダベリンのみが検出されている (Fig. 1-3 と Fig. 5-2 参照)。いずれの培養でも、大腸菌はプトレスシン, カダベリン, アグマチンを菌体内含量にほぼ比例して培養液 (培養上清) 中に放出 (分泌) している (Fig. 6-1B)。

緑膿菌では、カダベリン含量に差を認めるものの、合成 199 培地, 合成 1640 培地でも天然 NB 培地での培養と同一のポリアミン構成であった (Fig. 6-1C)。アグマチン合成が検出しやすい 1640 培地でもアグマチンは全く検出されない。枯草菌では、1640 培地でスペルミジンのほかにアグマチンが主要ポリアミンとして検出された。また、アグマチンは培養上清中にも放出されていた (Fig. 6-1D)。SM や 199 などの合成培地や天然培地ではアグマチンは微量成分である。腸球菌で

は、SM 培地や 199 培地での培養と同様に 1640 培地でも全くポリアミンを合成しなかった (Fig. 6-1E)。1mM プトレスシンを添加した 199 培地での培養でもスペルミジンを合成しなかった。1mM スペルミジンを 199 培地および 1640 培地に添加して培養した場合は Fig. 6-1E に示すように、菌体から大量のスペルミジンを検出した。ただし、増殖の程度はスペルミジンの有無で差はなかった。スペルミジンを含む培地からのスペルミジンの取り込み活性の強い菌であることを確認した。

まとめ

ポリアミンのうちでもトリアミンやテトラアミンが核酸への結合親和性が高く、細胞内でその多くが RNA に結合して存在している。リボソーム RNA (rRNA) への結合によるリボソームタンパク質との集合体形成促進、転移 RNA (tRNA) への結合によるアミノアシル化反応の促進、メッセンジャー RNA (mRNA) の安定化、に働いている^{5,18-20)}。本研究で用いた常温増殖性の真正細菌 4 菌種はポリアミン成分としてスペルミンを欠き、スペルミジンが最も長鎖で高塩基性である。したがって、スペルミジンの合成や取り込みによる細胞内スペルミジンレベルの変動がリボソームの活性化と翻訳活性化に大きく影響することになる。事実、上述の 3 種類の RNA が関わるタンパク質合成系の抑制を作用点とするアミノ配糖体系、マクロライド系、テトラサイクリン系、クロラムフェニコール系の各抗生物質において、増殖阻害時のスペルミジンとアセチルスペルミジンレベルの変動が顕著であった。スペルミジンとこれら抗生物質の結合が競合しているものと考えられる。細胞壁合成阻害や DNA 複製酵素阻害を作用点としている抗生物質では、増殖の初期段階で活性が上昇して細胞増殖因子ともなるジアミン類の変動が大きかったように思われた。もともとプトレスシンやカダベリンのレベルが低い菌ではスペルミジンレベルに影響している。本研究は 7 系統の抗生物質のポリアミン含量に与える影響を網羅的に把握することを目的とし、統計処理による解析を加えていないので、個々の結果の詳細な解明は次の課題となる。

また、培養培地にポリアミンを添加する実験手法で、細菌における抗生物質感受性に対してスペルミンの添加が影響するとの報告がある²¹⁾。抗生物質の種類と濃度、対象菌種と培地の種類、培養条件などにより、各抗生物質による最小阻止濃度や 50% 増殖阻害濃度は様々で複雑でもある。スペルミンは常温増殖性の感染

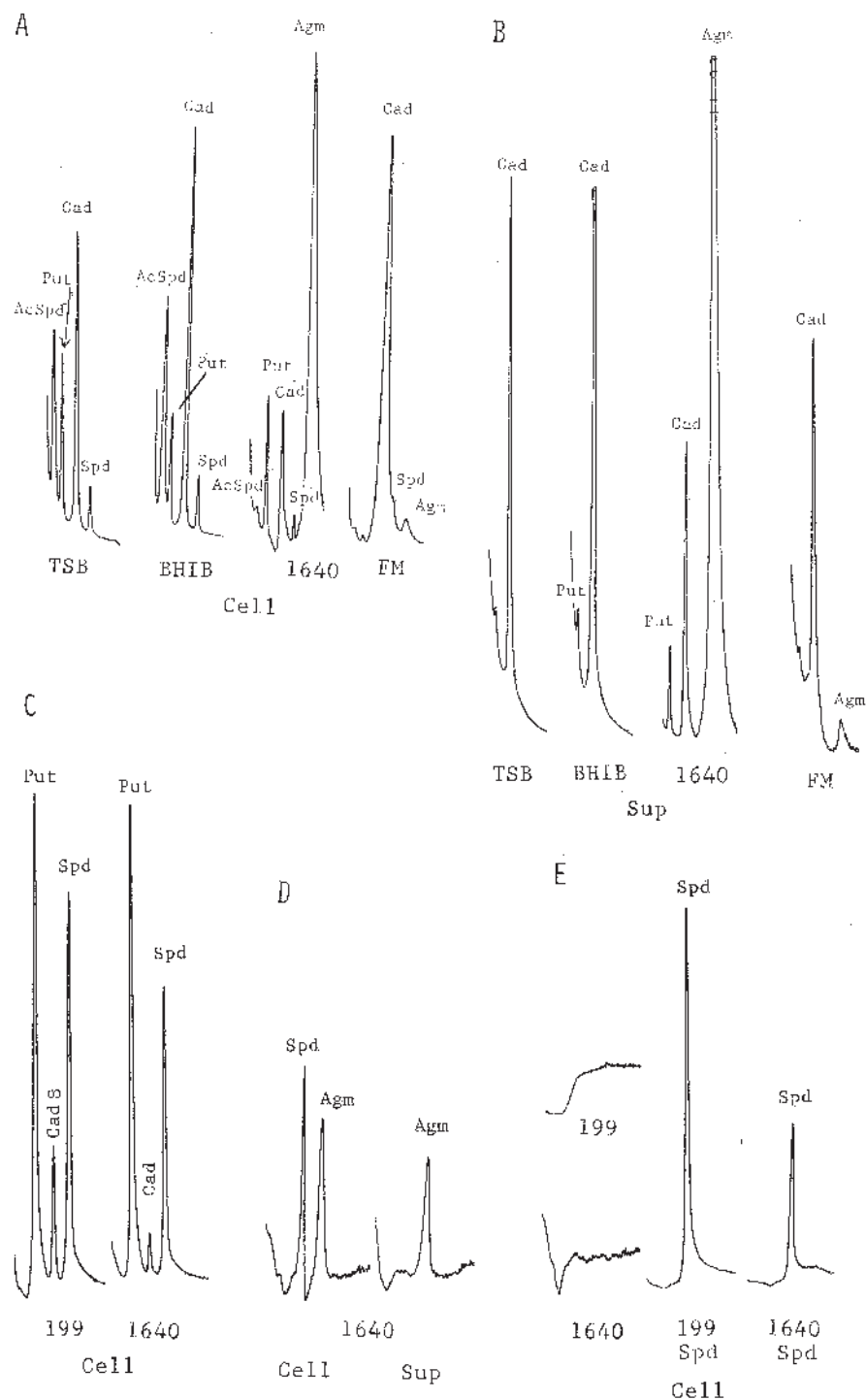


Fig. 6-1. HPLC analysis of polyamines extracted from the cells of *Escherichia coli* IAM 12119 grown in Trypticase Soy Broth (TSB), Brain Heart Infusion Broth (BHIB), RPMI1640 medium (1640) and Fisher's medium (FM) (A), and the culture supernatant (Sup) after the cultivation in the media (B). Polyamines extracted from the cells of *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1514 grown in 199 medium or 1640 medium (C). Polyamines extracted from the cells of *Bacillus subtilis* IAM 12118 grown in 1640 medium and its Sup (D). Polyamines extracted from the cells of *Enterococcus faecalis* JCM 5803 grown in 199 medium, 1640 medium, the 199 medium supplemented with 1 mM spermidine (Spd) or the 1640 medium supplemented with 1 mM spermidine (Spd) (E). Abbreviations for polyamines are as shown in Fig. 1-1.

症原因細菌や臨床的に通常分離される細菌には含有されていないポリアミンでもあり、その結果の判断は難しい。本報告では、幾つかの細菌と抗生物質と培地の組み合わせにて、培地中に添加したスペルミジンはかなりの高濃度でも細菌の抗生物質に対する感受性や耐性に影響を与えていない結果であった。

謝辞, その他

細菌株を提供していただいた各菌株保存機関に感謝申し上げます。当研究室では、「Polyamine World in Life」(生命におけるポリアミンの世界)を確立すべく、あらゆる生物を対象に、あらゆる角度からのポリアミン分析研究を進めている。本報告は、平成13年度から17年度の5年間の学部学生の卒業研究と平成14-15年度の大学院生の前期課程特別研究の一部分として行われ、その後、指導教授浜名康栄による追加・再実験を行い、平成19年度にその主要部分をまとめて紀要論文とした。図表の一部は、卒業論文5編と修士(保健学)学位論文(横山)に掲載されたものを修正・改変して利用したので、スタイルが統一されていない所もあります。和文論文としたが、図表に関しては英語表記が適切なので英文とさせていただいた。

文 献

- 1) 酒井克治. 最新抗生剤要覧 第11版. 薬業時報社 2000
- 2) 五十嵐一衛. 神秘の生命物質ポリアミン. 共立出版 1993
- 3) 五十嵐一衛, 柏木敬子. 神秘の生命物質ポリアミン. 化学と生物 1997; 35: 442-450
- 4) 浜名康栄. 細菌類のポリアミン構成と化学分類. 日本微生物資源学会誌 2002; 18: 17-43
- 5) 浜名康栄, 細谷隆一. 好熱性真正細菌と好熱性古細菌のポリアミン. 化学と生物 2006; 44: 320-330
- 6) Cohen SS. A guide to the polyamines. Oxford University Press, Oxford, 1998
- 7) 白幡 晶. ポリアミンの生理的役割の探求-生合成阻害剤の利用-. 化学と生物 1990; 28: 162-171
- 8) 浜名康栄. 細菌類のポリアミン分析. 群馬保健学紀要 2002; 23: 149-158
- 9) Hamana K, Satake S. Absence of cellular polyamines in gram-positive anaerobic cocci and lactic acid bacteria. J Gen Appl Microbiol 1995; 41: 159-163
- 10) Hamana K, Akiba T, Uchino F, Matsuzaki S. Distribution of spermine in bacilli and lactic acid bacteria. Can J Microbiol 1989; 35: 450-455
- 11) Hamana K. Distribution of diaminopropane and acetylspermidine in Enterobacteriaceae. Can J Microbiol 1995; 42: 107-114
- 12) Hamana K. Polyamine distribution catalogues of clostridia, acetogenic anaerobes, actinobacteria, bacilli, heliobacteria and haloanaerobes within gram-positive eubacteria. Microbiol Cult Coll 1999; 15: 9-28
- 13) Hamana K, Sakamoto A, Tachiyanagi S, Terauchi E. Polyamine profiles of some members of the gamma subclass of the class Proteobacteria: Polyamine analysis of twelve recently described genera. Microbiol Cult Coll 2003; 19: 3-11
- 14) Hamana K, Satake S, Iyobe S, Matsuzaki S. Polyamine distribution patterns in Pseudomonas, Alkaligenes and Comamonas. Ann Rep Coll Med Care Technol Gunma Univ 1992; 13: 105-109
- 15) 橋本 一. 薬はなぜ効かなくなるか. 中央公論社 2000
- 16) 三橋 進(編) 薬剤感受性測定法. 講談社 1980
- 17) 横山洋子, 浜名康栄. アミノ配糖体抗生物質のイオン交換HPLC分析. 群馬保健学紀要2004; 25: 183-189
- 18) 五十嵐一衛. 細胞増殖・分化に果たすポリアミンの効果. 生化学 1993; 65: 86-104
- 19) 五十嵐一衛. ポリアミンによる大腸菌細胞増殖の調節. 化学と生物 2004; 42: 363-364
- 20) Kouvel EC, Petropoulos AD, Kalpaxis DL. Unraveling new features of clindamycin interaction with functional ribosomes and dependence of the drug potency on polyamines. J Biol Chem 2006; 281: 23103-23110
- 21) Kwon DH, Lu CD. Polyamine effects on antibiotic susceptibility in bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 2070-2077

Inhibition of Growth and Cellular Polyamine Synthesis of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis* by Antibiotics

Koei HAMANA^{1)*}, Yoko YOKOYAMA¹⁾, Satomi TACHIYANAGI¹⁾,
Rie TERAUCHI¹⁾, Tomomi AIZAKI¹⁾, Eri ARAI¹⁾, Aya SAITO¹⁾,
Kaoru UCHIKATA¹⁾, Hajime OHNISHI¹⁾, Wakako SATO¹⁾,
Kanakan GOUMA¹⁾, Jia Yu¹⁾, Yurie INO¹⁾, Yukiko UMEMURA¹⁾,
Chiharu MOCHIDUKI¹⁾ and Ryuichi HOSOYA¹⁾

Abstract : Cellular polyamines extracted from the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis* grown in the absence or presence of antibiotics belonging to seven chemical families, at fifty percent growth-inhibitory concentration (IC₅₀), were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). *E. coli* synthesizes putrescine (Put), cadaverine (Cad), agmatine (Agm), spermidine (Spd) and acetylspermidine (AcSpd), *P. aeruginosa* Put, Cad and Spd, and *B. subtilis* Put, Spd and Agm. *E. faecalis* produces no polyamines and uptake Spd from media. Cellular levels of the polyamines were compared between control bacteria and the inhibited bacteria by antibiotics. All polyamine levels in *E. coli*, and Spd and/or Agm levels in *B. subtilis* and *E. faecalis* were not sensitive for the presence of Vancomycin (glycopeptide). By Benzylpenicillin, Piperacillin and Flomoxef (β -lactam), Put, Cad, AcSpd were decreased and Spd was increased in *E. coli*, and Spd in *B. subtilis* and *E. faecalis* was decreased. Streptomycin, Kanamycin and Amikacin (aminoglycoside) repressed acetylation of Spd in *E. coli* and Cad synthesis in *P. aeruginosa*, including sensitive and resistant strains for the drugs. AcSpd level in *E. coli* and Spd level in *B. subtilis* and *E. faecalis* were decreased in the presence of Erythromycin (macrolide), Tetracycline (tetracycline) and Chloramphenicol (phenylalanine derivative). AcSpd, Put and Cad in *E. coli* and Spd in *B. subtilis* were decreased whereas Spd was not effective to Ofloxacin and Norfloxacin (pyridone carboxylic acid). AcSpd synthesis in *E. coli* was inhibited whereas Spd uptake in *E. faecalis* was not, by the antibiotics.

Key words : Antibiotics, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, Polyamine

¹⁾ School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Gunma University
Maebashi, Gunma 371-8514, Japan

* Reprint address